

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/EP05/003220

International filing date: 26 March 2005 (26.03.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: DE
Number: 102004016653.6
Filing date: 31 March 2004 (31.03.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 22 July 2005 (22.07.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

08. 07. 2005

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 10 2004 016 653.6

Anmeldetag: 31. März 2004

Anmelder/Inhaber: BASF Plant Science GmbH, 67056 Ludwigshafen/DE

Bezeichnung: Verwendung von hydroxypropylierter hochamylose-
haltiger Kartoffelstärke zur Erzielung hoher KIT-Zah-
len

IPC: B 65 D 65/42

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**

München, den 29. Juni 2005
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Wehner

Patentansprüche

1. Mehrschichtige Verpackung für fettende Güter oder Teil einer solchen Verpackung, umfassend
- 5
- eine Trägerschicht aus einem polymeren Material als Hauptkomponente und
 - mindestens eine auf die Trägerschicht aufgebrachte, nicht die Außenseite der Verpackung bildende Schicht, die ein Hochamylose-Stärkederivat mit
- 10
- einem Amylosegehalt von mindestens 70% als Hauptkomponente enthält, dadurch gekennzeichnet, dass das Hochamylose-Stärkederivat ein mit einem C₂-C₆-Alkylenoxid modifiziertes Stärkederivat ist.
2. Mehrschichtige Verpackung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Hochamylose-Stärkederivat ein mit einem C₂-C₄-Alkylenoxid modifiziertes Stärkederivat ist.
- 15
3. Mehrschichtige Verpackung oder Teil einer solchen Verpackung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das C₂-C₆-Alkylenoxid Propylenoxid ist.
- 20
4. Mehrschichtige Verpackung oder Teil einer solchen Verpackung nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Hochamylose-Stärkederivat durch Modifizierung ggf. teilabgebauter Mais-, Weizen-, Kartoffel-, HA Erbsen- oder Tapiokastärke erhalten wird.
- 25
5. Mehrschichtige Verpackung oder Teil einer solchen Verpackung nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass der Derivatisierungsgrad des Stärkederivats 0,1 bis 1, stärker bevorzugt 0,1 bis 0,4 beträgt.
- 30
6. Mehrschichtige Verpackung oder Teil einer solchen Verpackung nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das polymere Material der Trägerschicht ein natürlich vorkommendes Polymer, vorzugsweise Cellulose, ist.
- 35
7. Mehrschichtige Verpackung oder Teil einer solchen Verpackung nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die ein Hochamylose-Stärkederivat als Hauptkomponente enthaltende Schicht zusätzliche Bestandteile, ausgewählt unter Pigmenten, Weichmachern, die Langzeitstabilität erhöhenden Mitteln, die Wasserstabilität erhöhenden Mitteln und die Elastizität beeinflussenden Mitteln, enthält.
- 40

2

- 5 8. Verwendung einer mit einem C₂-C₆-Alkylenoxid derivatisierten Hochamylose-Stärke als Hauptkomponente einer Schicht einer mehrschichtigen Verpackung, die auf einer Trägerschicht dieser Verpackung aus einem polymeren Material aufgebracht ist, zur Erzeugung von Fettdichtigkeit der mehrschichtigen Verpackung.
9. Verwendung nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass das C₂-C₆-Alkylenoxid Propylenoxid ist .
- 10 10. Verwendung nach einem der Ansprüche 8 oder 9, dadurch gekennzeichnet, dass das Stärkederivat durch Modifizierung von Hochamylose-Kartoffelstärke erhalten wird und ggf. einen Derivatisierungsgrad von 0,1 bis 1, stärker bevorzugt von 0,1 bis 0,4 aufweist.
- 15 11. Verwendung nach einem der Ansprüche 8, 9 oder 10 dadurch gekennzeichnet, dass zur Modifizierung eine Hochamylose-Kartoffelstärke mit einem Amylosegehalt von mindestens 70 % verwendet wird.
- 20 12. Verwendung nach einem der Ansprüche 8 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass die genannte Schicht zusätzliche Bestandteile, ausgewählt unter Pigmenten, Weichmachern, die Langzeitstabilität erhöhenden Mitteln, die Wasserstabilität erhöhenden Mitteln, den KIT-Wert erhöhenden Mitteln und die Elastizität beeinflussenden Mitteln, bevorzugt ausgewählt unter Glycerin, Harnstoff, Borax oder Glyoxal, enthält.
- 25

Verwendung von hydroxypropylierter hochamylosehaltiger Kartoffelstärke zur Erzielung hoher KIT-Zahlen

Beschreibung

5

Gegenstand der Erfindung sind mehrschichtige, fettdichte Verpackungsmaterialien mit einer Trägerschicht, die aus Papier/Karton oder anderen geeigneten, auf Polymeren basierenden Stoffen bestehen.

10

Weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung von fettdichtem Verpackungsmaterial mit einer KIT-Zahl von größer 21 durch Verwendung von hydroxypropylierter hochamylosehaltiger Kartoffelstärke mit einem Amylosegehalt von größer 70 %.

15

Es ist seit langem bekannt, Papier- und Kartonbehälter mit Beschichtungen zu versehen, die eine Sperrwirkung für Aromen oder Feuchtigkeit/Flüssigkeiten besitzen. So beschreibt die Patentanmeldung DE 41 09 983 A 1 ein flexibles Verpackungsbehältnis mit einem Verbund aus einer Papierschicht und einer thermoplastischen Schicht oder Folie. Das thermoplastische Schicht- oder Folienmaterial besteht aus Stärke, einem synthetischen, nicht- polyolefinischen, hydroxylgruppenhaltigen Polymeren, z.B. einem oxygenierten Polymeren, sowie Weichmachern natürlichen Ursprungs, z.B. stärkeabgeleiteten Polyalkoholen. Dieses Material kann durch Wärmezufuhr aufgeschmolzen werden und ist daher extrudierbar. In der Patentanmeldung DE 41 37 802 A1 wird vorgeschlagen, einen Karton mit einer beschichteten Papierbahn zu kaschieren, um ein verrottbares, flüssigkeitsabweisendes Produkt zu erhalten. Die Beschichtung der Papierbahn soll auf Stärkebasis erfolgen. Die Patentanmeldung DE 42 94 110 offenbart eine Beschichtungsdispersion, die aus Copolymerisaten von oxidierte Stärke und Styrol, Butadien, Acrylsäure oder ähnlichen polymerisierbaren Molekülen erzeugt wird. Diese Dispersion vermindert die Gas- und Wasserdurchlässigkeit von Karton oder Papier.

20

25

30

35

Allerdings ist es häufig notwendig, Verpackungsmaterialien mit hoher Fettdichtigkeit bereitzustellen. So fordern Tiernahrung, Backwaren, Konfekt und Schokolade von der Verpackung eine besonders hohe Fettdichtigkeit, die beispielsweise durch die KIT-Zahlen mit Werten zwischen 8 und 12 angegeben werden. Hohe KIT-Zahlen stehen dabei für hohe Fettdichtigkeiten.

40

Entsprechende im Handel angebotene Papier-/Kartonverpackungen sind üblicherweise einer fettabweisenden Oberflächen- und/oder Massebehandlung unterzogen worden. Für diese Massebehandlung bzw. Oberflächenbehandlung werden derzeit vor allem Fluorpolymere eingesetzt, wobei etwa bis zu 5 Gew.-% Beschichtungsmaterial auf das Material gelangen. Bereits Fettdichten > 6 bis 8 können nur durch Kombinationen von

Schicht- und Massebehandlung erreicht werden, Fettdichten mit KIT-Zahlen > 12 können mit den gegenwärtigen Systemen nicht garantiert werden. Beispielsweise erfordert das Verpacken von trockenem Tierfutter mit niedrigem Fettgehalt ($< 10\%$) eine Behandlung der Rückseite in der Masse, bei höheren Fettgehalten wird eine Barriere durch Massebehandlung in Kombination mit einer Oberflächenbeschichtung durchgeführt.

Papier-, Papp- und Kartonverpackungen werden ordnungsgemäß über den Altpapierkreislauf entsorgt. Die als Fettbarriere eingesetzten Halogenpolymere gelangen somit über die Papieraufbereitung entweder in die Papierneuware oder in das Prozessabwasser.

Stärkeether sind als Hilfsstoffe und Einsatzstoffe in der Papierindustrie bekannt. Dabei genutzte Eigenschaften sind in der einschlägigen Literatur ausführlich beschrieben. Sie werden eingesetzt in der Oberflächenbeschichtung bzw. dem Strich sowie in pigmentierten Papierbeschichtungen. Auch für den Lebensmittelkontakt zugelassene Papiere, Kartons und Pappen dürfen nach dem BGVV Stärkeether (z.B. Hydroxyethyl- und Hydroxypropylether) enthalten. Stärkeether werden wegen ihrer guten Filmbildungseigenschaft und ihrem Wasserbindevermögen außerdem als Bestandteil von Klebstoffen verwendet. Literatur hierzu findet sich beispielsweise in Ullmanns Enzyklopädie der technischen Chemie; W. Baumann/B. Herberg: Papierchemikalien - Fakten zum Umweltschutz (Springer-Verlag); O.B. Würzburg:

Modified Starches: Properties and Uses (CRC Press).

WO 02/02412 beschreibt mehrschichtige Verpackungen für fettende Güter basierend auf nativer, modifizierter Stärke.

Weiterhin ist bekannt, dass Stärkeether-Derivate zu Folien bzw. Filmen verarbeitet werden können, vornehmlich in Gießtechnik aus einer wässrigen Lösung.

Wenn die Herstellung der Stärkeether nach dem Slurry-Verfahren erfolgt, wird die wässrige Stärkesuspension im Alkalischen bei Temperaturen bis zu 50°C derivatisiert. Der Derivatisierungsgrad liegt dabei meist um 0,2. Charakteristisch für diese Verfahren ist die bevorzugte Derivatisierung am C2-Atom. Ein anderes, vornehmlich aus wissenschaftlichen Untersuchungen bekanntes Verfahren (Autoklav-Verfahren) geht von alkalisch aktivierter Stärke aus und kommt bei geringeren Trockensubstanz-Konzentrationen zu homogenen Derivatisierungen, wobei der Derivatisierungsgrad allerdings ähnlich eingestellt wird. Ein Vorgehen nach dieser Strategie ist in der Patentanmeldung DE 42 23 471 A1 beschrieben, wobei die so erhaltenen Stärkeether zur Folienherstellung eingesetzt werden sollen, und zwar insbesondere für die Anwendung als Overhead-, Kopier- und Druckerfolien oder für die Oberflächenveredlung von Spezialpapie-

ren sowie als Verpackungsmaterial. Darüber hinaus wird in dieser Druckschrift erwähnt, dass die genannten Etherderivat-Folien auch im Verbund mit anderen Materialien verwendet werden können.

- 5 Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist die Bereitstellung von lebensmittelrechtlich zulässigen, fettdichten Verpackungsmaterialien mit sehr hoher KIT-Zahl.

- 10 Überraschenderweise hat sich herausgestellt, dass Substrate, die selbst keine ausreichende Fettbeständigkeit aufweisen, wie Papier, Karton, Pappe oder andere aus oder mit Cellulose hergestellte Materialien, dann fettdicht sind, wenn sie mit alkylendioxyderivatisierter Stärke mit einem Amylosegehalt von größer 70% beschichtet sind.

- 15 Die vorliegende Erfindung stellt daher mehrschichtige Verpackungen für fettende Güter oder Teile solcher Verpackungen bereit, die eine Trägerschicht aus einem polymeren Material als Hauptkomponente sowie mindestens eine auf die Trägerschicht aufgebrachte, nicht die Außenseite der Verpackung bildende Schicht aufweisen, wobei die auf die Trägerschicht aufgebrachte Schicht eine alkylendioxyderivatisierte Stärke mit einem Amylosegehalt von größer 70% als Hauptkomponente enthält. Das hierfür verwendete Alkylendioxy kann in gut geeigneter Weise ein C₂-C₆-Alkylendioxy sein. C₂-C₄-
20 Alkylendioxyde sind bevorzugt.

- 25 Die Beschichtung eines Trägermaterials mit der Funktionsschicht "Hochamylose(HA)-Stärkederivat" realisiert ein fettdichtes Verbundsystem. Die HA-Stärkekomponente ist dabei verantwortlich für die Fettdichtigkeit und weist zudem die Eigenschaft der biologischen Abbaubarkeit auf. Außerdem lässt sich eine solche Stärke gut in Beschichtungsmassen für den angegebenen Zweck einarbeiten, da sie - im Gegensatz zu nativer Stärke - nicht zum Re-Aggregieren (Retrogradation) neigt.

- 30 Die Verpackungen der vorliegenden Erfindung sind nicht auf spezifische Ausgestaltungen beschränkt. Ein beispielhafter, bevorzugter Anwendungsbereich sind Verpackungen von Lebens- und Tierfuttermitteln mit geringen Wassergehalten und gleichzeitig hohen Fettgehalten, insbesondere Faltschachteln. Beispiele hierfür sind Verpackungen für Kekse, Schokoladen, sonstige Süßwaren, trockenes Tierfutter, bei denen eine besonders gute Barriere gegen den Durchtritt von Wasserdampf nicht erforderlich ist.
35 Aber auch Verpackungen für fetthaltige Nicht-Lebensmittel (z.B. Kosmetika, ölhaltige Farbpigmente oder dergleichen) können erfindungsgemäß gestaltet werden.

- 40 Weitere Anwendungsmöglichkeiten liegen in der Beschichtung von anderen Polymeren als Cellulose mit dem erfindungsgemäß vorgeschlagenen Material (z.B. andere Verpackungsmaterialien) für ähnliche Verpackungsaufgaben. Auch die Beschichtung von Papier im Sinne eines Einschlagpapiers ist eine mögliche Anwendung.

Mit den Verpackungsmaterialien der vorliegenden Erfindung lassen sich hohe Fettdichtigkeiten erzielen, die im Bereich ab einer KIT-Zahl von 10, vorzugsweise von mindestens 17, in der Regel aber wesentlich höher liegen. So können Dichtigkeiten einer KIT-Zahl von über 21 erreicht werden, die mit den bisherigen, nicht biokompatiblen bzw. -
5 abbaubaren Systemen nicht garantiert werden können.

Weitere Vorteile der erfindungsgemäßen Verpackungen sind, dass ihre Herstellung mit üblichen Verfahren der Papier- bzw. Kartonherstellung kompatibel ist und dass sie biologisch abbaubar sind, wobei sie hinsichtlich der ökonomischen und/oder ökologischen
10 Bewertungen im Vergleich zu üblichen Systemen als besonders vorteilhaft einzustufen sind, insbesondere wenn die Faktoren Preis der Beschichtung einschließlich Verfahrenskosten und die Verträglichkeit mit dem Papierrecyclingprozess berücksichtigt werden sollen.

Aufgrund ihrer Bioabbaubarkeit gewährleisten die erfindungsgemäß beschichteten Verpackungen eine gute Verträglichkeit mit den Aufbereitungs- und Abwasserreinigungsmöglichkeiten von Altpapierentsorgungsanlagen. Hier stellt das Abbauverhalten im Papierkreislauf im Sinne der Vermeidung eines weiteren Störstoffeintrags einen entscheidenden Vorteil dar. Geeignete Materialien für die Trägerschicht sind insbesondere
20 Papier, Pappe oder Karton, ggf. in Mischung mit anderen geeigneten oder in der Verpackungstechnologie von Lebensmitteln üblichen oder zulässigen Stoffen wie Bindemitteln oder Farbstoffen. Aber auch andere, bevorzugt auf natürlichen Polymeren wie Cellulose oder dergleichen basierende Materialien oder Kunststoffe können eingesetzt werden.

Erfindungsgemäß geeignete HA-Stärkederivate sind solche, die mit einem Alkylenoxid wie Ethylenoxid oder Propylenoxid oder einem längerkettigen Alkylenoxid derivatisiert wurden. Die angelagerten Gruppen vergrößern die Abstände zwischen den Molekülketten und steigern damit deren Beweglichkeit. Der damit gegebene innere Weichma-
25 chungseffekt kann nur durch eine Zerstörung der chemischen Bindung rückgängig gemacht werden.

Das HA-Stärkederivat sollte auf der Trägerschicht vorzugsweise einen geschlossenen Film bilden. Sofern dies der Fall ist, können bereits sehr dünne Schichten ab etwa
35 6 g/m² Flächengewicht fettdicht sein, sofern das Trägermaterial eine relativ hohe Glätte aufweist.

Die Beschichtung kann als Oberflächenschicht der Innenseite der Verpackung und/oder als Zwischenschicht, ggf. auch mit der Funktion einer verklebenden Schicht
40 zwischen Papier oder Kartonagelagen oder dergleichen vorgesehen sein. Auch mehrere direkt aufeinander aufgetragene Beschichtungen können vorteilhaft sein. Ebenso kann vor der Beschichtung mit dem HA-Stärkederivat ein sogenannter Vorstrich (z.B.

mit üblichen Papierbeschichtungsmitteln wie Kaolin oder Stärke) zur Anwendung kommen, der den Zweck einer Vorglättung der Oberfläche hat. Flächengewichte zum Erzielen einer fehlstellenfreien Schicht können so ggf. reduziert werden.

- 5 Die das HA-Stärkederivat enthaltende Schicht kann ggf. durch Aufbringen einer selbsttragenden Schicht aus diesem Material auf die Trägerschicht gelangen. Vorzugsweise wird jedoch eine Lösung oder Suspension des HA-Stärkederivats mit einer geeigneten Menge an Trockensubstanz erzeugt und auf dem Trägermaterial aufgetragen, vorzugsweise aus wässriger Lösung oder Suspension. Eine gut geeignete Menge an Trockensubstanz (TS) des HA-Stärkederivates liegt im Bereich von etwa 5 bis etwa
- 10 50 Gew.-%, bevorzugt im Bereich von etwa 10 bis etwa 40 Gew.-%, wobei die tatsächlich zu wählende Menge vom vorgesehenen Auftragsverfahren abhängt. So kann in manchen Fällen eine Menge von bis hinunter zu 4 Gew.-% ausreichend sein.
- 15 Das Auftragen kann beispielsweise mit einem Rakel, Sprühen oder per Walzenauftrag erfolgen, ebenso durch "Druckgießen" einer konzentrierteren Lösung sowie durch das flächige Aufbringen einer thermoplastifizierten Schmelze ("Extrusion"). In allen Fällen sollte der Wassergehalt des HA-Stärkederivates nach dem Aufbringen auf dem Trägermaterial vorzugsweise auf < 25 Gew.-% reduziert werden (z.B. durch Trocknen mit
- 20 IR oder konvektiv).

- Neben dem HA-Stärkederivat kann die auf der Trägerschicht aufzubringende Schicht auch weitere Additive enthalten. Zum einen bietet sich die Zugabe von Pigmenten (wie generell in der Papierindustrie üblich) an, andererseits die Zugabe von Glycerin, Harnstoff, Borax, Glyoxal oder anderen Zusatzstoffen mit ähnlichen Eigenschaften und Effekten, um gewünschte Werte bezüglich der Elastizität und der Wasser- und Langzeitstabilität zu erzielen. Auch die KIT-Zahl lässt sich in manchen Fällen durch Zusatz solcher Stoffe positiv beeinflussen, z.B. durch Zusatz von Glycerin oder Vernetzer (z.B. Glyoxal). Der Anteil an Hochamylose-Stärkederivat sollte vorzugsweise aber immer so
- 25 hoch sein, dass die Ausbildung eines fehlstellenfreien Films gewährleistet ist.
- 30

- Als Ausgangsmaterial wird vorzugsweise Kartoffelstärke mit einem Amylose Anteil von größer 70 % verwendet. Eine Kartoffelstärke mit einem Amyloseanteil von über 70 % kann beispielsweise aus genetisch modifizierten Kartoffelpflanzen isoliert werden, in denen die enzymatische Aktivität der Stärkeverzweigungsenzyme SBE I und II gegenüber der nicht genetisch modifizierten Ausgangspflanze reduziert ist. Ein Verfahren zur Herstellung derartiger Pflanzen ist beispielhaft in Beispiel 1 beschrieben. Weitere Beschreibungen zur Herstellungen von gentechnisch modifizierten Kartoffelpflanzen mit einem Amyloseanteil von größer 70 % sind in den Patentanmeldungen WO 92/11375,
- 35 WO 97/20040, WO 92/14827, WO 95/26407 und WO 96/34968 und den Patenten US 5,856,467 US 6,169,226, US 6,469,231, US 6,215,042, US 6,570,066 und US 6,103,893 beschrieben.
- 40

Kartoffelpflanzen mit einer reduzierten enzymatischen Aktivität der Stärkeverzweigungsenzyme SBE I und SBE II können alternativ auch durch Selektion von geeigneten mutagenisierten Kartoffelpflanzen gewonnen werden.

5

Als Ausgangsmaterialien können auch Stärken mit einem Amyloseanteil von größer 70 % aus anderen Kulturpflanzen wie beispielsweise aus Mais, Weizen, Erbsen oder Tapioca eingesetzt werden. Pflanzen mit einem Amylose Gehalt von größer 70 % können durch genetische Modifikation unter Verwendung molekularbiologischer Methoden und/oder durch Züchtung und Selektion hergestellt werden.

10

Unter HA-Stärke wird eine Stärke mit einem Amylosegehalt von mindestens 70 % verstanden. Vorzugsweise liegt der Amylosegehalt bei mindestens 80 %, besonders bevorzugt bei mindestens 90 %.

15

Die chemische Modifizierung der Kartoffelstärke mit einem Amylosegehalt von größer 70 % erfolgt beispielsweise mit einem C₂- oder C₃-Äthylenoxid. Propylenoxid ist bevorzugt.

20

Da die HA-Stärke in geeigneter Weise in Gegenwart von Base modifiziert wird, die für die Beschichtung vorgesehene Masse jedoch günstigerweise in etwa neutral reagieren sollte, so dass im Normalfall eine Neutralisierung mit Säure erfolgen muss, ist die modifizierte HA-Stärke in der Regel stark mit Salzen behaftet. Es ist von Vorteil, wenn dieser Salzgehalt nicht zu hoch ist. So empfiehlt es sich, dass die Beschichtungsmasse in der für den Auftrag vorgesehenen Konzentration eine Leitfähigkeit von nicht mehr als 4.000 - 5.000 pS/cm, vorzugsweise von < 2.000 pS/cm besitzt.

25

Die Zugabe von Säuren und Laugen sollte unter dem Gesichtspunkt erfolgen, dass das entstehende Salz lebensmittelrechtlich unbedenklich ist. Geeignete Säuren sind Phosphorsäuren, eine geeignete Base ist Natronlauge. Die Entsalzung kann beispielsweise durch Dialyse erfolgen.

30

Beschichtungen mit höher derivatisierter HA-Stärke zeigen günstigere KIT-Zahlen als solche mit geringeren Derivatisierungsgraden. Es ist aber nicht erforderlich, hohe Substitutionsgrade zu erreichen, denn bereits geringe Grade können zu positiven Effekten führen. Diese hängen aber auch von der Herkunft der eingesetzten HA-Stärke ab. Während ganz allgemein ein Derivatisierungsgrad von 0,05 bis 1,5 geeignet sein kann, sind Bereiche zwischen 0,1 bis 1,0, ganz besonders zwischen 0,1 und 0,3 bevorzugt.

35

Die Herstellung einer als Beschichtungsmasse oder Gießlösung für die vorliegende Erfindung geeigneten HA-Stärkeetherlösung kann beispielsweise wie folgt erfolgen: Die Stärke mit einem Amylosegehalt von größer 70 % (z.B. Weizen-, Mais-, Tapioka,

40

- Kartoffel- oder HA-Erbsenstärke) wird in annähernd dem Doppelten ihres Gewichts an Wasser einige Stunden gerührt und anschließend grob vom Wasser befreit, z.B. durch Abnutschen. Sie nimmt dabei etwa ihr eigenes Gewicht an Wasser auf, so dass sie ungefähr 40 bis 60% Trockenmasse besitzt. Anschließend wird sie in etwa dem 1,5-fachen ihres Feuchtgewichts resuspendiert und durch Zugabe der gleichen Menge etwa 10%iger Base oder Lauge desintegriert. Sofort darauf werden innerhalb weniger Minuten bis ca. 1 Stunde etwa 25 - 75 Gew.-% Alkylenoxid, vorzugsweise Propylenoxid, bezogen auf das Ausgangsgewicht der trockenen HA-Stärke, zugeführt, wobei milde Temperaturen eingehalten werden sollten. Raumtemperatur ist gut geeignet.
- Man lässt die Mischung mehrere Stunden rühren und anschließend etwa 20 Stunden ruhen; anschließend wird sie mit Säure neutralisiert. Soll eine Entsalzung erfolgen, geschieht dies z.B. durch Dialyse gegen Wasser. Die entsalzte Lösung wird ggf. schonend aufkonzentriert. Der Derivatisierungsgrad der HA-Stärke liegt bei Anwendung von etwa 50 Gew.-% Propylenoxid bei etwa 0,2, in anderen Fällen entsprechend darüber oder darunter.
- Eine Entsalzung oder Abtrennung störender Inhomogenitäten kann auch beispielsweise mittels Ultrafiltration erfolgen. Sollte das Produkt zu konzentriert sein, kann eine Verdünnung mit entionisiertem Wasser vorgenommen werden.
- Nach Zusatz der möglicherweise gewünschten Additive (z.B. Konservierungsstoffe, Füllstoffe, Antistatika, Mittel zur Verbesserung der Elastizität, Vernetzungsmittel) kann bei Bedarf mittels Filter oder Zentrifuge eine mechanische Separation durchgeführt und dabei gleichzeitig eine Entgasung der zu verarbeitenden Lösung erreicht werden.
- Eine für die Zwecke der Erfindung besonders geeignete Beschichtungslösung besitzt die folgenden rheologischen Eigenschaften:
- Eine dynamische Viskosität von 0,1 Pas bis 40 Pas bei einer Temperatur von 25°C und einer Schergeschwindigkeit von 30,7 s⁻¹. Viskoelastische Eigenschaften der Polymerlösung, wobei das Verhältnis zwischen viskosem und elastischem Anteil Tan K Werte zwischen 1 und 10 (max. 50) bei einer Temperatur von 25°C und einer Schergeschwindigkeit von 30,7 s⁻¹ annimmt. Mit dem beispielhaft genannten Verfahren lassen sich solche Werte ohne weiteres erhalten.
- Das Verfahren bietet ferner den Vorteil, dass die HA-Stärke besonders schonend und insbesondere durchgängig bei relativ niedrigen Temperaturen (< 60°C) oder vollständig bei Raumtemperatur umgesetzt und verarbeitet wird, was positive Effekte für die Beschichtung des Trägermaterials bewirkt. Durch die Kaltwasserlöslichkeit nach der Neutralisation, Separation, Salzabtrennung und dem Aufkonzentrieren kann die Stärke mit einem Amylose Gehalt von 70 % derart schonend verarbeitet werden, dass keine oder nur unbedeutende Abbaureaktionen einsetzen.

Die wässrige Gießlösung kann vorzugsweise bei Raumtemperatur oder leicht erhöhten Temperaturen mit einem geeigneten Auftragssystem (z.B. Rakel) auf die zu beschichtende Materialbahn (Papier) aufgebracht werden.

5

10

15

Besonders günstig hat sich die Verwendung von nach dem Autoklav-Verfahren hergestellten Hydroxypropyletherstärken, insbesondere aus Kartoffelstärke mit einem Amylosegehalt von größer 70 % erwiesen, die als Lösungen mit Trockensubstanz-Gehalten von 12 bis 20 Gew.-% und vorzugsweise mit Derivatisierungs-(DS-)Graden von 0,1 bis 1,0, stärker bevorzugt bis 0,4, eingesetzt werden. Diese zeigen im Vergleich mit Handelsmustern (mit Fluorcarbonsäuren beschichtet) deutlich bessere Fettdichtigkeiten, insbesondere auch in Knickstellenbereichen, die bei Faltschachtelanwendungen besonders kritisch sind. Im Vergleich zu den zuvor genannten erfindungsgemäßen Beschichtungen mit handelsüblichen Stärkederivaten können die für die Beschichtung mit diesen Stärken eingesetzten Flächengewichte reduziert werden.

Beispiel 1

Herstellung von transgenen Kartoffelpflanzen mit hohem Amylosegehalt

20

Kartoffelpflanzen mit einem Amylosegehalt von größer 70 % können hergestellt werden unter Verwendung der Antisense- oder der RNAi-Technologie mit dem Ziel die enzymatische Aktivität der Stärkeverzweigungsenzyme SBE I und SBE II zu reduzieren bzw. zu eliminieren.

25

30

35

40

Beispielsweise wurde die HA-Stärke produzierende transgene Kartoffellinie *Solanum tuberosum* AM99-2003 hergestellt in der die Aktivität der Stärkeverzweigungsenzyme inhibiert ist. Die genetische Transformation der Ausgangssorte Dinamo wurde durchgeführt mit einem Genkonstrukt, welches Genfragmente unter Kontrolle eines GBSS-Promoters von SBE I und SBE II in antisense-Orientierung enthält. PBluescript enthaltend ein 1620 Basenpaare langes Fragment des 3' Endes des SBE I Genes zwischen EcoRV und SpeI wird mit SpeI und XbaI geschnitten und ligiert mit einem 1243 Basenpaare SstI-XbaI Fragment des 3' Endes von SBE II. Der SBE I und der SBE 2 Komplex wird mit Hilfe von EcoRV und XbaI herausgeschnitten und in den mit SmaI und XbaI geöffneten Binärvektor pHo3.1 ligiert. Der entstandene Vektor wird mit pHabe12A bezeichnet, siehe Abbildung 1 und Nukleinsäuresequenz SEQ-ID No. 1. PHo3.1 basiert auf pGPTVKan (Becker, D. et al., Plant Molecular Biology 20 (1992), 1195-1197) und enthält zusätzlich den 987 Basenpaare umfassenden GBSS-Promotor (siehe EP 0 563 189) der in die HindIII Stelle von pGPTVKan kloniert und dessen uidA Gen mit Hilfe von SmaI und SstI entfernt wurde.

Die Elternlinie Dinamo wird mit dem Konstrukt pHabe12A mit der in US 6,169,226 beschriebenen Methode transformiert und die transgenen Linien auf Kanamycin-haltigen

Medien selektioniert. Die Analyse des Amylosegehaltes der transgenen Pflanzen erfolgte nach der bei (Morrison, W.R. and Laignelet, B., J. Cereal. Sci. 1 (1983), 9-20) beschriebenen Methode.

- 5 Transgene Kartoffelpflanzen mit einem Amylosegehalt von mindestens 70 % wurden selektioniert und angebaut. Die hochamylosehaltige Stärke wurde nach herkömmlichen Methoden isoliert.

Beispiel 2

- 10 Hydroxypropylierung von hochamylosehaltiger Kartoffelstärke

15 Hochamylosehaltige Kartoffelstärke gewonnen aus genetisch modifizierten Kartoffelpflanzen - siehe Beispiel 1 - wurde im Labormaßstab hydroxypropyliert. Die Modifizierung der Kartoffelstärke mit einem Amylosegehalt von 70 % erfolgte gemäß eines Autoklav- bzw. Homogenverfahrens.

20 Nach der Hydroxypropylierungsreaktion wurde die Lösung für die spätere Beschichtung von Karton durch Entsalzung und Aufkonzentrierung aufbereitet. Das Endprodukt sollte einen Derivatisierungsgrad von ca. 0,2, einen Trockengehalt (w/w) von ca. 18% sowie eine Leitfähigkeit von ca. 600 μ /cm aufweisen.

Im Rahmen der Versuche zur Kartonbeschichtung wurden mit der hydroxypropylierten HA-Stärke mittels Handrakelauftrag verschiedene Auftragsgewichte erzeugt.

- 25 Zur Beschichtung des Kartons (Firma Cupforma) wurde die HA-Stärke auf 40°C erwärmt. Die HA-Stärkelösung wurde (einmal bzw. zweimal) auf die gestrichene sowie ungestrichene Seite des Kartons aufgetragen.

Beispiel 3

- 30 Charakterisierung des Endproduktes

35 Ausgehend von 713 g HA-Stärke aus Kartoffelpflanzen mit einem Amylosegehalt von 70 % - hergestellt nach der in Beispiel 1 beschriebenen Methode - wurden 1770 g Hydroxypropyl-HA-Stärke mit einem Trockengewicht von 27 (w/w) % und einer Leitfähigkeit von 880 μ S/cm hergestellt. Die Leitfähigkeit konnte durch Diafiltration nicht weiter gesenkt werden.

Beispiel 4

Prüfung der Fettdichtigkeit anhand des 3M-KIT-Tests

- 5 Für die Überprüfung auf die Resistenz gegenüber nicht polaren Substanzen, wird die Beschichtung auf die Dichtigkeit gegenüber Gemischen mit 2 l Prüflösungen unterschiedlicher Konzentrationen an Rizinusöl, Toluol und n-Heptan getestet. Die KIT-Lösung mit der höchsten Zahl, die 15 Sekunden auf der Probe stand ohne einen Durchschlag bzw. eine Verfärbung zu bewirken, ist die kennzeichnende KIT-Zahl.

10

Es wurden Kartons der Firma Cupforma verwendet.

Die Tabelle fasst die Ergebnisse zusammen.

Beschichtung in μm	Auftragsgewicht g/m^2	KIT-Test
12	52,7	>21
24	12,1	>21
24 x 2	44,6	>21

15

In allen drei Fällen erwies sich die Beschichtung mit einer KIT-Zahl > 21 als fettdicht gemäß KIT-Test nach 3M.

Beispiel 5

20

713 g Kartoffelstärke mit einem Amylosegehalt von 70 % werden in 1,3 l destilliertem Wasser 4 Stunden lang gerührt und dann abgenutscht. Die feuchte Stärke wird mit 1,824 l Wasser aufgerührt und mit 1.811 g 10%iger Natronlauge, gewonnen durch Mischen von 376 g 50%iger NaOH mit 1.505 g Wasser versetzt. Die Derivatisierung erfolgt mit 323 g Proylenoxid bei 23°C, das innerhalb von 20 min unter Rühren zugesetzt wird. Man lässt die Mischung noch weitere 4 h rühren und 20 h ruhen. Neutralisiert wird mit 40%iger Phosphorsäure (ca. 700 g). Danach wird die Lösung in Dialyseschlauche gefüllt und ca. 4 Tage bei täglichem Wasserwechsel dialysiert. Das Produkt wird mit Hilfe eines Vacuum-Rotationsverdampfers auf über 20% Trockenmasse aufkonzentriert.

30

Der erhaltene HA-Stärkeether besitzt einen Derivatisierungsgrad von etwa 0,2. Die Leitfähigkeit der Beschichtungsmasse liegt bei etwa 1100 pS/cm.

- 35 Analog zu diesem Beispiel werden die nachstehenden Beschichtungsmassen hergestellt und mit einer 20 μm Rakel auf einseitig gestrichenen Chromo Duplexkarton (GD2), 310 g/m^2 , Dicke ca. 420 μm aufgetragen. Nach der Trocknung des ersten Auf-

trags (fingertrocken, ca. 2 h Dauer) wird eine zweite Schicht aufgetragen und bei Raumtemperatur und etwa 50% Raumfeuchte über etwa 1 Woche, ggf. auch länger, getrocknet.

- 5 An drei Kartonbögen der beschichteten Muster erfolgt die Bestimmung der Auftragsmasse durch Wägung (nach DIN 53 104: Prüfung von Papier und Pappe, Bestimmung des Flächengewichts, Sept. 1971) und der Dicke mit einem Dickenmessgerät (Taster: plan/ballig, 30 SKT, MB = 1 µm). Außerdem wird die KIT- Zahl für unpolare Substanzen nach dem 3M KIT-Test bestimmt. Dabei dienen Lösemittelgemische aus Rizinusöl, Toluol und Heptan als Testflüssigkeiten. Die KIT-Lösung mit der höchsten Zahl, die 15 sec. auf der Probe steht, ohne einen Durchschlag oder eine Verfärbung zu bewirken, ist die kennzeichnende KIT-Zahl.

Verwendung von hydroxypropylierter hochamylosehaltiger Kartoffelstärke zur Erzielung hoher KIT-Zahlen

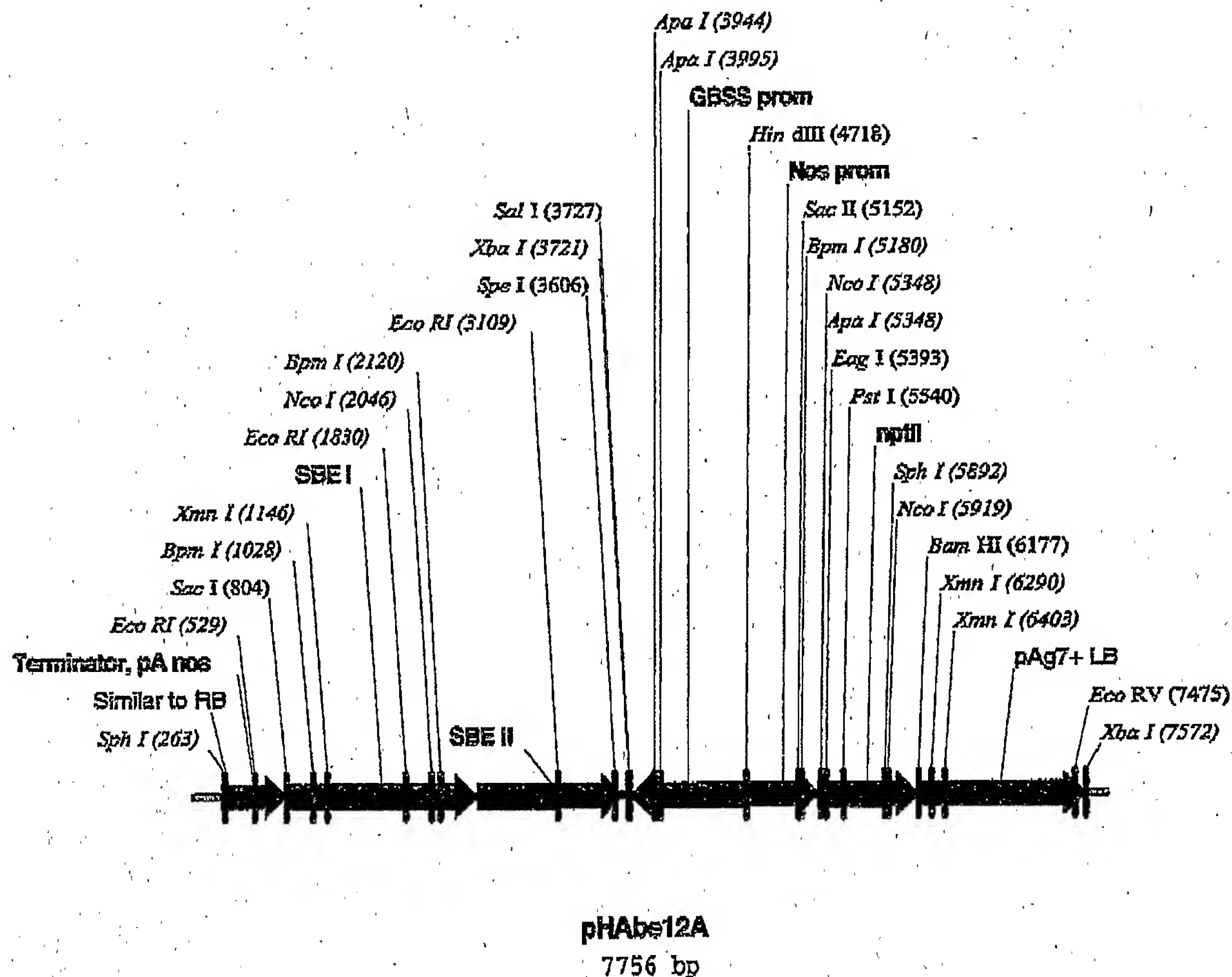
Zusammenfassung

5

Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung von fettdichtem Verpackungsmaterial mit einer KIT-Zahl von größer 21 durch Verwendung von hydroxypropylierter hochamylosehaltiger Kartoffelstärke.



Figur 1



SEQUENZPROTOKOLL

<110> BASF Plant Science GmbH

5 <120> Verwendung von hydroxypropylierter Kartoffelstärke zur
Erzielung hoher KIT-Zahlen

<130> AE20040256

10 <140> AE20040256

<141> 2004-03-31

<160> 1

15 <170> PatentIn Ver. 2,1

<210> 1

<211> 15294

<212> DNA

20 <213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Vektor
pHabel2A

25

<400> 1

ggcgcgggagg	gttcgagaag	gggggggcacc	ccccttcggc	gtgcgcgggtc	acgcgcacag	60
gggcgcagccc	tgggttaaaaa	caagggtttat	aaatatattgt	ttaaaagcag	gttanaagac	120
agggttagcgg	tggccgaaaa	acggggcgaa	acccttgcaa	atgctggatt	ttctgcctgt	180
ggacagcccc	tcaaattgtca	ataggtgcgc	ccctcatctg	tcagcactct	gcccctcaag	240
tgtcaaggat	cgcgccectc	atctgtcagt	agtcgcgcgc	ctcaagtgtc	aataccgcag	300
ggcacttate	cccaggcttg	tccacatcat	ctgtgggaaa	ctcgcgtaaa	atcaggcggt	360
ttcgcgcgatt	tgcgaggctg	gccagctcca	cgtcgcgcgc	cgaaatcgag	cctgcccctc	420
atctgtcaac	gcgcgcgcgc	gtgagtcggc	ccctcaagtg	tcaacgtccg	ccctcatctc	480
gtcagtgagg	gccaagtgtt	ccgcgaggta	tccacaacgc	cggcggccgc	ggtgtctcgc	540
acacggcttc	gacggcggtt	ctggcgcggt	tgcaggggcca	tagacgggcg	ccagcccagc	600
ggcgaggggca	accagccogg	tgagcgtcgc	aaaggcgctc	ggtcttgctc	tgctcgtcgg	660
tgatgtactt	cacoagctcc	gcgaagtgcg	tcttcttgat	ggagcgcgat	gggacgtgct	720
tggcaatcac	gcgcaccccc	cggccggttt	agcgggtaaa	aaagtcatgg	ctctgccctc	780
gggcgggacca	cgcccacatc	gaccttgcca	agctcgtcct	gcttctcttc	gatcttcgce	840
agcagggcgca	ggatcgtggc	atcacccgac	cgcgcgcgtc	gccccgtcgc	ggtgagccag	900
agtttcagca	ggccgcgccg	gcggcccgag	tcgccattga	tgcggggccg	ctcgcggacg	960
tgctcatagt	ccacgacgcc	cgtgatcttg	tagecctggc	cgacggccag	caggtagggc	1020
gacagggtca	tgccggccgc	cgcgcgcctt	tcttcaatcg	ctcttcgttc	gtctggaagg	1080
45 cagtacacct	tgataggtgg	gctgcacctc	ctggttggct	tggtttcate	agccatccgc	1140
ttgcccctcat	ctgttacgcc	ggcggtagcc	ggccagcctc	gcagagcagg	attcccgttg	1200
agcaccgcca	ggtgcgaata	agggacagtg	aagaaggaa	accgcctcgc	gggtgggctc	1260
acttcacctc	tcttgcgcgc	ctgacgcctg	tggatacacc	aaggaaagtc	tacacgaacc	1320
cttttgccaaa	atcctgtata	tcttgcgaaa	aaggatggat	ataccgaaaa	aatcgtatata	1380
50 atgacccccga	agcagggtta	tgcagcggaa	aagcgcacag	cttcccgaag	ggagaaaggc	1440
ggacaggtat	ccggttaagcg	gcagggtcgg	aacaggagag	cgcacgaggg	agcttccagg	1500
gggaaacgcc	tgggtatctt	atagtcctgt	cgggttccgc	caactctgac	ttgagcgtcg	1560
atcttttgtga	tgctcgtcag	ggggggcggg	cctatggaaa	aacgccagca	acgcggcctt	1620
tttacagggtc	ctggcctttt	gctggccttt	tgctcacatg	ttctttcctg	cgttatcccc	1680
55 tgattctgtg	gataaccgta	ttacogcctt	tgagttagct	gataccgctc	gccgcagccg	1740
aacgaccgag	cgcagcaggt	cagtgagcga	ggaagcggaa	gagcgcacga	aggccggccg	1800
agaggccgag	cgcggccggt	aggtctggac	gctagggcag	ggcatgaaaa	agcccgtagc	1860
gggctgctac	gggcgtctga	cgcgggtggaa	agggggaggg	gatgttgtct	acatggctct	1920
gctgtagtga	gtgggttgcg	ctccggcagc	ggtcctgata	aatcgtcacc	ctttctcggg	1980
60 ccttcaaatgt	tcttgacaac	gagcctcctt	ttcgccaatc	catcgacaat	caccgcgagt	2040
ccttgcctga	acgctgcctc	cggaccgggt	tcgtogaagg	cgtctatcgc	ggcccgcaac	2100
agcggcgaga	gcggagcctg	ttcaacgggt	ccgcgcgcgt	cgcggccatc	gctgtcgcgc	2160
gocctgctcot	caagcacggc	cccaacagtg	aagtagctga	ttgtcatcag	cgcattgacg	2220
gcgtcccccg	cggaaaaaac	cgcctcgcag	aggaagcgaa	gctgcgcgtc	ggccggtttc	2280

2

	atctgcgggtg	cgcccggtcg	cgtgcgggca	tggatgcgcy	cgccatcgcy	gtaggcgagc	2340
	agcgcttccc	tgaagctgcy	ggcattcccg	atcagaaatg	agcgccagtc	gtcgteggct	2400
	ctcgccaccc	aatgcgtatg	attctccgcy	agcatggctt	cgccagtgcy	gtcgagcagc	2460
	gcccgccttg	tcctgaagtg	ccagtaaagc	gcgggctgct	gaacccccaa	ccgttccgcy	2520
5	agtttgctg	tcgtcagacc	gtctacgcy	acctcgttca	acaggtccag	ggcggaacgg	2580
	atcactgtat	tcggctgcaa	ctttgtcatg	cttgacactt	tatcactgat	aaacataata	2640
	tgtccaccaa	cttatcagtg	ataaagaatc	cgcgcgttca	atcggaaccag	cgagggtgcy	2700
	tcgggagggc	agacgtgaaa	cccaacatac	ccctgatcgt	aattctgagc	actgtcgcgc	2760
	tcgacgctgt	cgccatcgcy	ctgattatgc	cggtgctgcy	gggcctcctg	cgcgatctgcy	2820
10	ttcactcgaa	cgacgtcacc	gcccactatg	gcattctgct	ggcgctgtat	gcgttggtgc	2880
	aatttgctgt	cgccactgtg	ctgggcygcy	tgtcggatcg	tttcggggcg	cgcccaatct	2940
	tgtcgtcttc	gctggccgcy	gccaagatct	ggggaaccc	gtggttgcca	tgcacataca	3000
	aatggacgaa	cggaataaac	ttttcaagcy	cttttaataa	tcgattattt	ctaataaacg	3060
	ctctttttct	ttagggtttac	cgcccaatat	atcctgtcaa	acactgatag	tttaaacctga	3120
15	aggogggaaa	cgacaatctg	atcatgagcg	gagaattaa	ggagtcacgt	tatgaccccc	3180
	gcccgatgac	cgggacaagc	cgttttacgt	ttggaaactg	cagaaccgca	acgttgaaag	3240
	agccactcag	cgcatctgaa	ttcccgatct	agtaacatag	atgacaccgc	ggcgataaat	3300
	ttatcctagt	ttgcgcgcta	tattttgttt	tctatecgct	attaaatgta	taattgcygg	3360
	actctaatac	taaaaaccca	tctcataaat	aacgtcatgc	attacatggt	aattattaca	3420
20	tgtctaacgt	aattcaacag	aaatttatat	ataatcatcg	caagaccgcy	aacaggatct	3480
	aatcttaaga	aactttattg	ccaaatgttt	gaacgatcgy	ggaaattcga	gctcggtacc	3540
	atcatgttac	aaactttttt	gctgtgagca	gtagatatgg	aaaccgcyg	gacctaaagt	3600
	atctgataga	taaagcacat	agcttggttt	tacaggttct	ggtggatgta	gttcacagtc	3660
	atgcaagcaa	taatgccact	gatggcctca	atggctttga	tattggccaa	ggttctcaag	3720
25	aatcctactt	tcatgctgga	gagcaagggt	accataagtt	gtgggatagc	aggctgttca	3780
	actatgccaa	ttggggaggt	cttcggttcc	ttctttccaa	cttgagggtg	tggctagaag	3840
	agtataaact	tgaecggatt	cgatttgatg	gaataaottc	tatgctgtat	gttcacatg	3900
	gaatcaatat	gggattttaca	ggaaactata	atgagtattt	cagcgaggct	acagatgttg	3960
	atgctgtggt	ctattttaatg	ttggccaata	atctgattca	caagattttc	ccagacgcaa	4020
30	ctgttattgc	cgaagatgtt	tctggtatgc	cgggcccttg	ccggccctgt	tctgaggggg	4080
	gaattgggtt	tgattaccgc	ctggcaatgg	caatcccaga	taagtggata	gattatttaa	4140
	agaataaaaa	tgatgaagat	tgggtccatg	aggaagtaac	atcgagtttg	acaaatagga	4200
	gatatacaga	gaagtgtata	gcataatgcy	agagccatga	tcagctctatt	gtcggtgaca	4260
	agaccattgc	atttctccta	atggacaaag	agatgtattc	tggcatgtct	tgcttgacag	4320
35	atgcttctcc	tgttattgat	cgagggaattg	cgcttcacaa	gatgatccat	tttttcacaa	4380
	tggccttggt	aggagagggg	tacctcaatt	tcattgggtaa	cgagtttggt	catcctgagt	4440
	ggattgactt	ccctagagag	ggcaataatt	ggtgttatga	caaagttaga	cgccagtgga	4500
	accttgccga	tagcgaacac	ttgagataca	agtttatgaa	tgcatttgat	agagctatga	4560
	attcgctcga	tgaaaagttc	tcattctctg	catcaggaaa	acagatagta	agcagcatgg	4620
40	atgatgagaa	gaagggtgtt	gtgtttgaac	gtggtgacct	ggtatttgta	ttcaacttcc	4680
	acccaaataa	cacatacga	gggtataaag	ttggatgtga	cttgccaggg	aagtacagag	4740
	ttgcactgga	cagtgatgct	tgggaatttg	gtggccatgg	aagagctggt	catgatgttg	4800
	accattttcac	atcacccaga	ggaataacctg	gagttccaga	aacaaatttc	aatggtcgtc	4860
	caaatttctt	caaagtgtg	tctcctgcy	gaacatgtgt	ggcttattac	agagttgacg	4920
45	aacgcattgt	agaaactgaa	gtttaccaga	cagacatttc	tagtgagcta	ctaccaacag	4980
	ccaatatcga	ggagagtga	gagaaactta	aagattcggt	atctacaaat	atcagtaacg	5040
	ttgacgaact	catgtcagaa	actgaagttt	accagacaga	catttctagt	gagctactac	5100
	caacagccag	tatcgaggag	agtgaacgga	aacttaagaa	ttcattatct	acaaatatca	5160
	gtacgtgggt	atcattggat	gtgggattcc	cgccctctta	attatggaaa	ctgggaggtt	5220
50	cttaggtatc	ttctctcaaa	tgcgagatgg	tgggtggatg	agttcaaatt	tgatggattt	5280
	agattcgatg	gtgtgacatc	aataatgtat	actcaccacg	gattatcggt	gggattcact	5340
	gggaactaca	aggaataactt	tggactcgca	actgatgtgg	atgctgttgt	gtatctgatg	5400
	ctgggtcaac	atcttattca	tgggcttttc	cagatgcaat	taccattggt	gaagatgtta	5460
	gcggaaatgcc	gacattttgt	attcccggtt	aagatggggg	tgttggtttt	gactatcgcy	5520
55	tgcattatgg	aattgctgat	aaatggattg	agttgctcaa	gaaacgggat	gaggattgga	5580
	gagtgggtga	tattgttcat	acactgacaa	atagaagatg	gtcggaaaag	tgtgtttcat	5640
	acgctgaaag	tcattgatcaa	gctctagtcg	gtgataaaac	tatagcattc	tggctgatgg	5700
	acaaggatat	gtatgatttt	atggctctgg	atagaccatc	aacatcatta	atagatcggt	5760
	ggatagcatt	gcacaagatg	attaggcttg	taactatggg	attaggagga	gaagggtacc	5820
60	taaatttcat	gggaaatgaa	ttcgccacc	ctgagtggat	tgatttccct	agggctgaac	5880
	aacacctctc	tgatggctca	gtaattcccg	gaaaccaatt	cagttatgat	aaatgcagac	5940
	ggagatttga	cctgggagat	gcagaatatt	taagataccg	tgggttgcaa	gaatttgacc	6000
	gggctatgca	gtatcttgaa	gataaatatg	agtttatgac	ttcagaacac	cagttcatat	6060
	cacgaaagga	tgaaggagat	aggatgattg	tatttgaaaa	aggaaaccta	gtttttgtct	6120

3

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60

ttaatttttca	ctggacaaaa	agctattcag	actatcgcat	aggctgcctg	aagcctggaa	6180
aatacaaggt	tgccttggac	tcagatgac	cacttttttg	tggcttcggg	agaattgac	6240
ataatgcga	atatttcacc	tttgaaggat	ggtatgatga	tcgtccctcg	tcaattatgg	6300
tgtatgcacc	tagtagaaca	gcagtgggtc	atgcactagt	agacaaagaa	gaagaagaag	6360
aagaagaagt	agcagttaga	gaagaagtag	tagtagaaga	agaatgaacg	aacttgtgat	6420
cgcggtgaaa	gatttgaagg	ctacatagct	ctagagtgca	cctgcatgaa	atcagaaata	6480
attggaggag	atgagtaaaa	gttaccactt	gttgagctgt	gtgagtgaat	gagtggagaat	6540
gaggaggtgc	ctgccttatt	tgtagcaggt	ttoagtgaac	cgtgtcaaga	gaatagcggg	6600
tggctatccc	ttagcagaag	gcaactgtgg	acactgtatt	atagggaat	gotcatcgac	6660
agtattatgg	gcccctctct	tgttgattca	cggtggact	tcaacttggg	ccttgcaatg	6720
ggcccgtccg	gttctgtctc	ctagtatcta	aaaaactaaa	ccaactccct	cctaccgcta	6780
ccacttgaca	ttcctatgtc	tcgtgttaat	taaattatta	ttatagtaat	taaaaataat	6840
atctaggtac	tggtaactgg	ccctccctcc	actagaatat	tagttacttc	ccccttagct	6900
ttgtattcca	aattactgta	aatatatttt	ctaatttttt	acgacaaaca	agatctaatt	6960
atgaatgcac	aattctaaag	gttgaatata	ttactttact	tggtttagcc	tatatataag	7020
tgcatttttag	tatttaagatt	gagatgcacg	gttctattac	aaaattgata	cactgctaaa	7080
ggaaggatgg	ttaaaaacaa	cattcaatgt	ttgttacatt	tcttccctatt	gtattttttt	7140
tttaacgagc	ttcccgata	catcataaca	tgtctccgtt	ccacttggca	ggaaaaaaa	7200
atacccaaac	aggaagatac	tgtcaagtat	atccatagat	gaggacttaa	tggataggct	7260
tttcgaggat	tcataaatca	taatatctgg	cgaggaggat	aattaaatac	ttgtgggttg	7320
tatcctgatt	actccgtcaa	cagccaaata	gaaaagtgtg	aaaagagaga	aaggattttg	7380
tacaagatac	tgttcgcat	gtaagtaar	gaacaaaacg	gagtaacata	atcttctatc	7440
tcgttaaagc	ttcacgctgc	cgaagcact	cagggcgcaa	gggctgctaa	ggaagcggaa	7500
cacgtagaaa	gcccagtcgc	agaaacgggt	ctgaccccg	atgaatgtca	gctactgggc	7560
tatctggaca	agggaaaacg	caagcgcaaa	gagaaagcag	gtagcttgca	gtgggcttac	7620
atggcgatag	ctagactggg	cggttttatg	gacagcaagc	gaaccgggat	tgcagctgg	7680
ggcgccctct	ggtaagggtg	ggaagccctg	caaagtaaac	tggatggctt	tcttgccgcc	7740
aaggatctga	tggcgcaagg	gatcaagatc	atgagcggag	aattaaggga	gtcacgttat	7800
gaccccccgc	gatgaacggg	gacaagccgt	tttacgtttg	gaaotgacag	aaccgcaacg	7860
ttgaaggagc	cactcagccg	cggtttctct	gagtttaaat	agctaagcac	atacgtcaga	7920
aaccattatc	gcgcgttcaa	aagtcgccta	aggtcactat	cagctagcaa	atatttcttg	7980
tcaaaaatgc	tccactgacg	ttccataaat	tccctcgggt	atccaattag	agtcctcatat	8040
tcactctcaa	tccagatctc	gactctagtc	gagggcccat	gggagcttgg	attgaacaag	8100
atggattgca	cgcagggtct	ccggccgctt	gggtggagag	gctattcggc	tatgactggg	8160
caacaacagc	aatcggctgc	tctgatgcgc	ccgtgttcgc	gctgtcagcg	cagggggcgc	8220
cggttctttt	tgtcaagacc	gacctgtccg	gtgccttgaa	tgaactgcag	gacgaggcag	8280
cgcggctatc	gtggctggcc	acgacgggcg	ttccttgccg	agctgtgctc	gaegtgtgca	8340
ctgaagcggg	aagggaactg	ctgctatttg	gcgaagtgcc	ggggcaggat	ctcctgtcat	8400
ctcaccttgc	tccgtccgag	aaagtatcca	tcattggctga	tgcattgcgg	cggctgcata	8460
cgcttgatcc	ggctacctgc	ccattcgacc	accaagcgaa	acatcgcatc	gagcgagcac	8520
gtactcggat	ggaagccggg	cttgtcgatc	aggatgatct	ggaagagag	catcaggggc	8580
tcgcgccagc	cgaactgttc	gccaggctca	agggcgccat	gcccagcggc	gaggatctcg	8640
tcgtgaccca	tggcgatgcc	tgettgcga	atatcatggt	ggaaaatggc	cgctttctct	8700
gattcatcga	ctgtggccgg	ctgggtgttg	cggaccgcta	tcaggacata	gcgttggcta	8760
cccgatgata	tgttgagag	cttggcggcg	aatgggctga	ccgcttcctc	gtgctttacg	8820
gtatcgcgcg	tcccgattcg	cagcgcatcg	ccttctatcg	ccttcttgac	gagttctctc	8880
gagcgggacg	caagctagct	tcgacggatc	cccgatgag	ctaagctagc	tatatcatca	8940
atttatgtat	tacacataat	atcgcaactc	gtctttcctc	taaggcaatg	taccagctga	9000
tataatcagt	tattgaaata	tttctgaatt	taaacttgca	tcaataaatt	tatgtttttg	9060
cttggactat	aatacctgac	ttgttatttt	atcaataaat	atttaaaact	tatttctttc	9120
aagatgggaa	ttaattcaat	ggcgtcggtt	ttacaacgtc	gtgactggga	aaaccctggc	9180
gttaccacca	ttaatcgctt	tgcagcacat	ccccctttcg	ccagctggcg	taatagcgaa	9240
gaggcccgca	ccgatcgccc	ttcccaacag	ttgcgcagcc	tgaatggcgc	ccgctccctt	9300
cgctttcttc	ccttcccttc	tcgcccaggt	cgcgggcttt	ccccgtcaag	ctctaaatcg	9360
ggggctccct	ttaggggttc	gatttagtgt	tttacggcac	ctcgacccca	aaaaacttga	9420
tttgggtgat	ggttcacgta	gtggggcctc	gccttgatag	acgggttttc	gccttttgac	9480
gttggagtcc	acgttctttt	atagtggact	cttgttccaa	actggaacaa	cactcaaccc	9540
tatctcgggc	tattcttttg	atcttataag	gattttgocg	atttcggaac	caccatcaaa	9600
caggattttc	gcctgctggg	gcaaacacgc	gtggaccgct	tgcctgcaact	ctctcagggc	9660
caggcggtga	agggcaatca	gctgttgccc	gtctcactgg	tgaanaagaa	aaccacccca	9720
gtacattaaa	aacgtccgca	atgtgttatt	aagttgtcta	agcgtcaatt	tgtttacacc	9780
acaatatato	ctgccaccag	ccagccaaca	gtcctccgac	cggcagctcg	gcacaaaatc	9840
accactcgat	acaggcagcc	catcagtcgg	ggacggcgct	agcgggagag	ccgttgtaag	9900
gcggcagact	ttgctcatgt	taccgatgct	attcgggaag	acggcaacta	agctgcccgg	9960

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60

tttgaacac	ggatgatctc	gcggagggtg	gcattgtgat	tgtaacgatg	acagagcggt	10020
gctgcctgtg	atcaaatatc	atctccctcg	cagagatccg	aattatcagc	cttcttatto	10080
atttctcgct	taaccgtgac	aggctgtcga	tcttgagaac	tatgccgaca	taataggaaa	10140
tcgctggata	aagccgctga	ggaagctgag	tggcgctatt	tctttagaag	tgaacgttga	10200
cgatatoaac	tccctatccc	attgctcacc	gaatgggtaca	ggtcgggggac	ccgaagttcc	10260
gactgtcggc	ctgatgcate	cccggctgat	cgaccccgaga	tctagatctg	gggctgagaa	10320
agcccagtaa	ggaaacaact	gtaggttcga	gtccgcgagat	cccccgggac	caaagggaagt	10380
agggttaaacc	cgctccgata	aggccgagcc	acgccaggcc	gagaacattg	gttcctgtag	10440
gcacgggat	tggcggatca	aacactaaag	ctactgggac	gagcagaagt	cctccggccg	10500
ccagttgcca	ggcggtaaaag	gtgagcagag	gcacggggagg	ttgcacttg	cgggtcagca	10560
cggttccgaa	cgccatggaa	acggcccccg	ccaggccccc	tgccagcccg	acaggatcta	10620
gcgctgcggt	tgggtgtcaac	accaacagcg	ccacggcccg	agttccgcaa	atagccccc	10680
ggacggocat	caatcgtatc	gggctaccta	gcagagccgg	agagatgaac	acgacctca	10740
gcggctgcac	agcgcctacc	gtcgcgcgga	ccccgcggcg	caggccggtag	accgaaataa	10800
acaacaagct	ccagaatago	gaaatattaa	gtgcgcgcgag	gatgaagatg	cgcatccacc	10860
agattcccgt	tggaaatctgt	cggacgatca	tcacgagcaa	taaacccgce	ggcaacgccc	10920
gcagcagcat	accggcgacc	cctcggccctc	gctgttcggg	ctccacgaaa	acgccgggaca	10980
gatgcgcctt	gtgagcgctc	ttggggcgct	cctcctgttt	gaagaccgac	agccaatga	11040
tctcgcgcct	gatgtaggcg	ccgaatgcca	cggcatctcg	caaccgttca	gcgaacgcct	11100
ccatgggctt	ttctctctcg	tgcctgtaaa	cggaccggaa	catctctgga	gctttcttca	11160
gggcccagaaa	tccgatctcg	cggaaatcct	gcacgtccgg	cgctccaaag	cgtcgaatct	11220
gagccctaat	cacaattgtc	aatttttaac	ctctgtttat	cggcagttcg	tagagcgccg	11280
cgtgcgtccc	gagcgatact	gagcgaagca	agtgcgtcga	gcagtgcccg	cttgttccctg	11340
aaatgccagt	aaagcgctgg	ctgctgaacc	ccagcccgga	actgaccoca	caaggcccta	11400
gcgtttgcaa	tgcaccaggt	catoattgac	ccaggcgctg	tccaccaggc	cgtgcctcgc	11460
caactottog	caggcttcgc	cgacctgctc	gcgccacttc	ttcacgcggg	tggaaatccga	11520
tccgcacatg	aggcgggaag	tttccagctt	gagcgggtac	ggctcccggg	gcgagctgaa	11580
atagtcgaac	atccgtccgg	ccgtccggcg	cagcttgccg	tacttctccc	atatgaattt	11640
cgtgtagtgg	tccccagcaa	acagcacgac	gatttccctc	tccatcagga	cctggcaacg	11700
ggacgttttc	ttgocacggg	ccaggacgcg	gaagcgggtg	agcagcgaca	ccgattccag	11760
gtgcccacag	cggtcgggag	tgaagcccat	cgccgtccgc	tgtaggcccg	acaggcattc	11820
ctcggccctc	gtgtaatacc	ggccattgat	cgaccagccc	aggtccctgg	aaagctcgta	11880
gaacgtgaag	gtgatccggt	cgcgcgatag	ggctgcgctc	gcgtactcca	acacctgctg	11940
ccacaccagt	tccatccctg	cggcccgccg	ctccagcccg	gtgtaggtga	tcttcacgtc	12000
cttgtttgag	tggaaaaatga	ccttgttttg	cagcgcctcg	cgcgggattt	tcttgttgcc	12060
cgtgggtgaac	agggcagagc	gggcccgtgc	gtttggcctc	gctccgctcg	tgtccgggca	12120
cggcgcaata	tccgaacaag	aaagctgcat	ttccttgatc	tgtcgtctcg	tgtgtttcag	12180
caacgcggcc	tgccttgccg	cgcgcacctg	ttttgcccag	tccctgcggg	cggttttctc	12240
cttcttgggc	gtcatagtcc	ctccgctgtc	gatgggtcac	gacttcgcca	aacctgcgcg	12300
ctcctgttgc	agacgacgcg	aacgctccac	ggcggccgat	ggcgcgggca	gggcaggggg	12360
agccagttgc	acgctgtcgc	gctcgatctt	ggccgtagct	tgtcggacca	tccagccgac	12420
ggactggaag	gtttccgggg	gogcagccat	gacgggtgcg	cttgcgatgg	tttcggcctc	12480
ctcggcgga	aaccccgcgt	cgatcagttc	ttgcctgtat	gccttccggg	caaacgtccg	12540
attcattcac	cctccttgcc	ggattgcccc	gactcacgcc	ggggcaatgt	gcccctattc	12600
ctgatttgac	ccgcctgggtg	ccttgggtgtc	cagataatcc	acottatccg	caatgaagtc	12660
ggtcccgtag	accgtctggc	cgtccttctc	gtacttggtg	ttccgaatct	tgccttgcc	12720
gaataccagc	gaccccttgc	ccaaataactt	gccgtgggcc	tccgctgag	agccaaaaca	12780
cttgatggcg	aagaagtcgg	tggcgtccctg	cttgtccgcg	gcacgttgc	gccacateta	12840
ggtactaaaa	caattcatcc	agtaaaatat	aatattttat	ttcttcccaa	tcaggcttga	12900
tcccagtaa	gtcaaaaaat	agctogacat	actgttcttc	cccgatatcc	tccctgacgc	12960
accggacgca	gaaggcaatg	tcataccact	tgtccgcctc	gccgcttctc	ccaagatcaa	13020
taaagccact	tacttttgcca	tctttcacaa	agatgttgct	gtctcccagg	tcccggtggg	13080
aaaagacaag	ttcctcttgc	ggcttttcgg	tctttaaaaa	atcatacagc	tccgcgggat	13140
ctttaaatgg	agtgtcttct	tcccagtttt	cgcaatccac	atccggccaga	tccgttattca	13200
gtaagtaatc	caattccggt	aagcggctgt	ctaagctatt	cgtataggga	caatccgata	13260
tgtcgatgga	gtgaaagagc	ctgatgcact	ccgcatacag	ctcgataatc	ttttcagggc	13320
tttgttccat	ttcatactct	tccgagcaaa	ggacgcctac	ggcctccactc	atgagcagat	13380
tgtccagcc	atcatgocgt	tcnaagtgoa	ggacctttgg	aacaggcagc	tttcttcca	13440
gccatagcat	catgtccttt	tcccgttcca	catcataggt	ggtcccttta	taccggctgt	13500
ccgtcatttt	taaatatagg	ttttcatttt	ctcccaccag	cttatatacc	ttagcaggag	13560
acattccctc	cgtatctttt	acgcagcggt	attttctgat	cagttttttc	aattccggtg	13620
atattctcat	tttagccatt	tattatttcc	ttctcttttt	ctacagtatt	taaagatacc	13680
ccaagaagct	aattataaca	agaagaaactc	caattcactg	ttccttgcat	tctaaaacct	13740
taaataccag	aaaacagctt	tttcaaagtt	gttttcaaag	ttggcgata	acatagtatc	13800

5

	gacggagccg	atcttgaaac	cacaattatg	ggatgatgctg	ccaacttact	gatttagtgt	13860
	atgatgggtg	ttttgaggtg	ctocagtggc	ttctgtgtct	atcagctgtc	cctcctgttc	13920
	agctactgac	gggttggtgc	gtaacggcaa	aagcaccgcc	ggacatcagc	gctatctctg	13980
	ctctcactgc	cgtaaaacat	ggcaactgca	gttcacttac	accgcttctc	aaccgggtac	14040
5	gcaccagaaa	atcattgata	tggccatgaa	cgccgttgga	tgcggggcaa	cagcccgcat	14100
	tatggggcgtt	ggcctcaaca	cgattttacg	tcacttaaaa	aactcaggcc	gcagtccgta	14160
	acctcgcgca	tacagccggg	cagtgcgctc	atcgtctgcg	cggaaatgga	cgaacagtgg	14220
	ggctatgtcg	gggctaaatc	gcgccagcgc	tggctgtttt	acgcgtatga	cagtctccgg	14280
	aagacgggtg	ttggcgacgt	attcgggtgaa	cgcactatgg	cgacgctggg	gcgtcttatg	14340
10	agcctgctgt	caccctttga	cgtgggtgata	tggatgacgg	atggctggcc	gctgtatgaa	14400
	tcccgctga	agggaaagct	gcacgtaatc	agcaagcgat	atacgacgag	aattgagcgg	14460
	cataacctga	atctgaggca	gcacctggca	cggctgggac	ggaagtccgt	gtcgtttcca	14520
	aaatcgggtg	agctgcatga	caaagtcata	gggcattatc	tgaacataaa	acactatcaa	14580
	taagttggag	tcattaccca	attatgatag	aatttacaag	ctataaggtt	attgtcctgg	14640
15	gtttcaagca	ttagtccatg	caagttttta	tgttttgccc	attctataga	tatatgtata	14700
	agcgcgctgc	ctatgccttg	ccccctgaaa	tccttacata	cggcgatata	tcctatatata	14760
	aagatatatt	atcttatcag	tattgtcaat	atattcaagg	caatctgcct	cctcatcctc	14820
	ttcatcctct	tcgtcttggg	agctttttta	atatggcgct	tcatagagta	attctgtaaa	14880
	ggccaatttc	tcgttttcat	acctcggtat	aatcttaoct	atcacctcaa	atggttcgcct	14940
20	gggttttatc	cacccccgaa	cacgagcacg	gcaccccgca	ccactatgcc	aagaatgcc	15000
	aaggtaaaaa	ttgccggccc	cgcacatgaag	tcogtgaatg	ccccgacggc	cgaagtgaag	15060
	ggcaggccgc	cacccaggcc	gcgcgcctca	ctgcceggca	cctggctcgt	gaatgtcgat	15120
	gccagcacct	gcggcacgct	aatgcttccg	ggcgtcgcgc	tcgggctgat	cgcccatccc	15180
	gttactgccc	cgatcccggc	aatggcaagg	actgccagcg	ctgccatttt	tggggtgagg	15240
25	cogttcgcgg	ccgagggggc	cagccctctg	ggggatggga	ggcccgcggt	agcg	15294